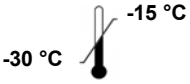
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

REF **95-438**

Una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección de ADN de 14 tipos de virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) en muestras cervicouterinas.

Dispositivo de diagnóstico clínico *in vitro*

Contiene reactivos suficientes para 96 pruebas



Limitación de temperatura

NO almacene en un congelador sin escarcha.

Proteja de la luz.

ÍNDICE

NOMBRE Y USO PREVISTO

ABREVIATURAS USADAS

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

REACTIVOS PROVISTOS

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS

REACTIVOS Y MATERIALES ADICIONALES

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA REALIZACIÓN DE ANÁLISIS

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTAS DE PROCEDIMIENTO Y PRECAUCIONES

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CONTROL DE CALIDAD

LIMITACIONES

RESULTADOS PREVISTOS

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

REFERENCIAS

GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

NOMBRE Y USO PREVISTO

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección cualitativa del ADN de 14 tipos de virus de papiloma humano (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) en muestras cervicouterinas. La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no puede determinar el tipo específico de VPH presente.

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ usa la química de Invader® como método de multiplicación de la señal para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Este método usa dos tipos de reacciones isotérmicas: una reacción primaria que se produce en la secuencia del ADN objetivo y una reacción secundaria que produce una señal fluorescente (consulte la Figura 1).

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se indica:

1) Para analizar pacientes con resultados de citología cervicouterina de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) y determinar la necesidad de derivación para la realización de una colposcopia.

2) En mujeres de 30 años o más, la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ puede usarse con citología cervicouterina para analizar y evaluar en forma conjunta la presencia o ausencia de tipos de VPH de alto riesgo. Esta información, junto con la evaluación médica de los antecedentes citológicos, otros factores de riesgo y las normas profesionales, puede usarse para guiar el tratamiento de las pacientes.

Las muestras cervicouterinas que pueden analizarse con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ incluyen el siguiente medio de obtención y dispositivo de obtención del sistema de conservación:

- Solución PreservCyt® con sistema de conservación ThinPrep® para pruebas de Papanicolaou
- Dispositivo tipo brocha (p. ej., brocha Rovers Cervex®, Wallach Papette®) o brocha/espátula para análisis cervicouterino

ADVERTENCIAS

- La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no está diseñada para su uso como un dispositivo de detección para mujeres menores de 30 años con citología cervicouterina normal.
- La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no está diseñada para sustituir el análisis de detección citológica cervicouterina frecuente.
- La detección del VPH mediante la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no diferencia tipos de VPH y no puede evaluar la persistencia de ninguno de ellos.

- El uso de esta prueba todavía no se ha evaluado para el tratamiento de mujeres con anomalías citológicas o histológicas previas, histerectomías, embarazo, posmenopausia u otros factores de riesgo (p. ej., VIH+, inmunodepresión, antecedentes de ITS).

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ está diseñada para mejorar los métodos existentes para la detección de la enfermedad cervicouterina y debe usarse junto con la información clínica derivada de otras pruebas de diagnóstico y detección, exploraciones físicas y antecedentes clínicos completos según los procedimientos apropiados para el tratamiento de la paciente.

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no debe usarse como único fundamento para la evaluación clínica y el tratamiento de las pacientes.

ABREVIATURAS USADAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNg:	ADN genómico
ASC-US:	células escamosas atípicas de significado indeterminado
CIN:	neoplasia intraepitelial cervicouterina
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio)
FAM:	fluoróforo carboxifluoresceína
FOZ:	curvatura sobre cero (la señal de la muestra o del control dividida por la señal de control negativo)
FRET:	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
HIST2H2BE:	gen de la histona humana 2, gen H2be
LoB	límite de blanco
LoD	límite de detección
Máx.	máximo
Mín.	mínimo
NILM:	resultado negativo del análisis de detección de lesiones intraepiteliales o neoplasia. Esta categoría engloba a las categorías anteriores: "dentro de los límites normales" y "cambios celulares benignos".
NTC:	control negativo
Oligo:	oligonucleótido
Pap:	prueba citológica cervicouterina de Papanicolaou
Red:	fluoróforo rojo Redmond®
RFU:	unidad de fluorescencia relativa
TWT:	Third Wave Technologies, Inc.
VPH:	virus de papiloma humano

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Se han registrado más de 100 tipos de VPH en la bibliografía, aproximadamente 40 de los cuales infectan el área anogenital y se transmiten por vía sexual. El VPH anogenital está asociado con casi todos los tipos de cáncer cervicouterino.[1] Anteriormente, se ha demostrado que es muy fácil prevenir el cáncer cervicouterino cuando se emplean programas de análisis citológicos y de detección del VPH para facilitar la detección y el tratamiento de lesiones precancerosas.

De los tipos de VPH de transmisión sexual, 14 genotipos oncogénicos (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) se consideran de alto riesgo debido a su íntima asociación con tipos de cáncer cervicouterino (en comparación con los tipos de VPH de bajo riesgo, que prácticamente no se asocian con el cáncer cervicouterino).[2,3] Aun así, la gran mayoría de las infecciones por VPH de alto riesgo son erradicadas.[4] Muy pocas mujeres con diagnósticos positivos de ADN de VPH de alto riesgo manifiestan una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) que indique una CIN2-3 subyacente o cáncer.[5] El riesgo absoluto de presentar una anomalía citológica incidental debido a una infección por VPH de alto riesgo varía en las distintas poblaciones.

La presencia de ADN de VPH de alto riesgo en forma concomitante con un resultado de citología equívoca o ambigua (ASC-US) coloca a la mujer en una posición de mayor riesgo de presentar una neoplasia intraepitelial cervicouterina subyacente 2 ó 3 (CIN2 o CIN3).[6,7,8] La CIN3, a pesar de que se produce sólo en aproximadamente un 5% de los casos de ASC-US,[9] es un precursor inmediato del cáncer cervicouterino y, por consiguiente, su detección es muy importante para el tratamiento de la paciente.[3] Por lo tanto, la identificación de las mujeres con citología ASC-US junto con una infección por VPH de alto riesgo es útil para que los médicos puedan decidir quiénes deberían controlarse más estrictamente.[3,6,10,11]

La bibliografía científica actual sugiere que una infección por VPH de alto riesgo persistente es el principal factor de riesgo de manifestar neoplasia cervicouterina de alta malignidad y cáncer.[4,12,13,14] La persistencia evidente puede representar una infección continua por un sólo tipo de VPH, múltiples tipos de VPH o una reinfección. Sin embargo, las mujeres con citología cervicouterina normal con resultados negativos de VPH de alto riesgo aparentemente presentan bajos riesgos de contraer o manifestar lesiones cervicouterinas precancerosas.[15,16]

Desde el año 2002, varios grupos de profesionales sanitarios de los EE.UU. comenzaron a publicar normas para el tratamiento de pacientes con recomendaciones acerca de cómo realizar análisis de detección de cáncer cervicouterino en mujeres según la edad, la presencia de anomalías citológicas en una muestra cervicouterina y otros factores.[7,17,15] Estas normas para el tratamiento de las pacientes recomiendan la realización de pruebas para la detección de tipos de VPH de alto riesgo como una herramienta habitual de cribado, junto con la citología, en instancias específicas. Las principales recomendaciones en relación a las pruebas de VPH de alto riesgo extraídas de las normas de las prácticas profesionales más recientes, las *2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests* (Pautas consensuadas en 2006 para el tratamiento de mujeres con resultados anómalos en las pruebas de detección de cáncer cervicouterino), incluyen: 1) el análisis de detección de mujeres de 30 años o más junto con la citología u otros métodos de detección y 2) el tratamiento de mujeres a partir de los 21 años de edad con ASC-US.[15,18] En todos los casos, las decisiones de tratamiento de las pacientes reflejan sus antecedentes citológicos generales y otros factores de riesgo además de la presencia o ausencia de tipos de VPH de alto riesgo.[7,10,18]

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ es un método de diagnóstico cualitativo *in vitro* para la detección de ADN de 14 tipos de VPH, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ usa la química de Invader® como método de multiplicación de la señal para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Este método usa dos tipos de reacciones isotérmicas: una reacción primaria que se produce en la secuencia del ADN objetivo y una reacción secundaria que produce una señal fluorescente (consulte la Figura 1). En la reacción primaria, dos tipos de oligonucleótidos específicos de la secuencia (es decir, un oligonucleótido de sonda y un oligonucleótido de Invader®) se unen a la secuencia del ADN objetivo. Cuando los oligonucleótidos se superponen en al menos un par de base en la secuencia objetivo, se forma una estructura invasiva que actúa como un sustrato de la enzima Cleavase®. La enzima segmenta la porción 5' (cola) de la sonda en la ubicación de la superposición.

Las sondas están presentes en un elevado exceso molar y activan y desactivan rápidamente la secuencia objetivo de modo que se generan muchas colas segmentadas de 5' por secuencia objetivo. Luego, las estructuras ramificadas partidas se unen a un oligonucleótido de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) universal en forma de horquilla y crean otra estructura invasiva que la enzima Cleavase® reconoce como un sustrato. La enzima parte los oligonucleótidos de la FRET entre el fluoróforo y la molécula extintora y produce una señal de fluorescencia a medida que las estructuras ramificadas segmentadas entran o salen del ciclo. Para cada copia del objetivo, las reacciones primaria y secundaria combinadas generan una multiplicación de la señal de 10^6 – 10^7 veces por hora.[19] Las secuencias de las colas y los oligonucleótidos de la FRET son universales, ya que no son complementarios de la secuencia objetivo.

Los reactivos de esta prueba se proporcionan como tres mezclas de oligonucleótidos, que detectan los 14 tipos de VPH agrupados según la relación filogenética, es decir, los tipos de virus con secuencias de ADN similares (grupos de VPH A5/A6, A7, A9). Los oligonucleótidos que se unen con el gen de la histona humana 2 (H2be, HIST2H2BE) también están presentes en estas tres mezclas de oligonucleótidos. El HIST2H2BE funciona como un control interno que produce una señal desde el ADN genómico presente en la muestra. El formato de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ permite la detección simultánea de secuencias de ADN de VPH y del HIST2H2BE en un mismo pocillo al utilizar dos secuencias de estructuras ramificadas de 5' diferentes en las sondas, como también dos oligonucleótidos de la FRET diferentes, cada uno con un fluoróforo de distinto espectro (FAM y Red). Por su diseño, las colas de 5' liberadas se unen sólo con sus respectivos oligonucleótidos de FRET para generar una señal objetivo específica (consulte la Figura 1).

Un resultado positivo indica que al menos uno de los 14 tipos de alto riesgo está presente en la muestra de ADN. Este resultado está representado por una señal fluorescente del FAM que se encuentra sobre un valor de corte derivado empíricamente. Para cada reacción, un resultado negativo está representado por una señal fluorescente del FAM que se encuentra por debajo de un valor de corte derivado empíricamente. Como medio de determinación de la cantidad relativa de ADN de la muestra en cada reacción, el gen de la histona humana 2 se mide mediante una señal de color rojo fluorescente que se encuentra sobre un valor de corte derivado empíricamente en cada reacción. La medida de este objetivo funciona como mecanismo de control de calidad para confirmar que un resultado negativo no se debe a una

muestra insuficiente. El objetivo del control interno también funciona como medida de procesamiento para garantizar que el procedimiento de la prueba se haya realizado correctamente.

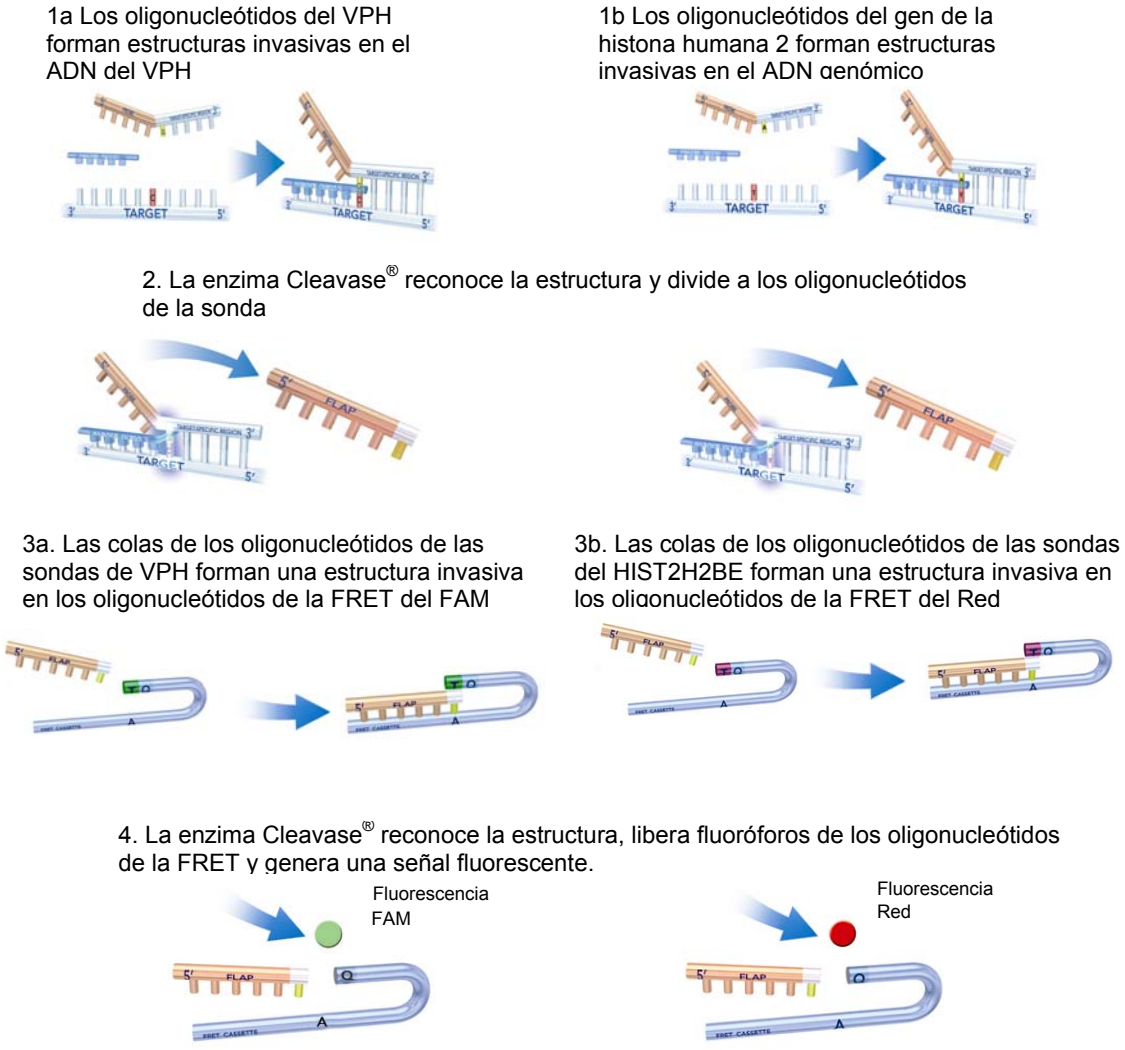

1a Los oligonucleótidos del VPH forman estructuras invasivas en el ADN del VPH
1b Los oligonucleótidos del gen de la histona humana 2 forman estructuras invasivas en el ADN genómico
TARGET
2. La enzima Cleavase® reconoce la estructura y divide a los oligonucleótidos de la sonda
FLAP
3a. Las colas de los oligonucleótidos de las sondas de VPH forman una estructura invasiva en los oligonucleótidos de la FRET del FAM
3b. Las colas de los oligonucleótidos de las sondas del HIST2H2BE forman una estructura invasiva en los oligonucleótidos de la FRET del Red
4. La enzima Cleavase® reconoce la estructura, libera fluoróforos de los oligonucleótidos de la FRET y genera una señal fluorescente.
Fluorescencia FAM
Fluorescencia Red

Figura 1: Una representación gráfica de la química de Invader® en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

REACTIVOS PROVISTOS

Tabla 1: Contenidos de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ (REF 95-438)

Reactivo	Abreviatura de la etiqueta del vial	Cantidad de viales y volumen del reactivo	Descripción de los componentes
Mezcla 1 de oligonucleótidos del VPH	O1 (Tapa y tira azules)	1 x 1400 µl	Oligonucléotidos con afinidad a los tipos 51, 56, 66 de VPH y el gen de la histona humana 2 suspendidos en agua y en amortiguador MOPS (pH 7.5)
Mezcla 2 de oligonucleótidos del VPH	O2 (Tapa y tira amarillas)	1 x 1400 µl	Oligonucléotidos con afinidad a los tipos 18, 39, 45, 59, 68 del VPH y el gen de la histona humana 2 suspendidos en agua y en amortiguador MOPS (pH 7.5)
Mezcla 3 de oligonucleótidos del VPH	O3 (Tapa y tira anaranjadas)	1 x 1400 µl	Oligonucléotidos con afinidad a los tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58 del VPH y el gen de la histona humana 2 suspendidos en agua y en amortiguador MOPS (pH 7.5)
Solución de la enzima Cleavase®	E (Tapa y tira púrpuras)	1 x 1100 µl	Enzima Cleavase® suspendida en 140 mM $MgCl_2$, 10 mM de Tris (pH 8.0), 25 mM de KCl, 0.25% de Tween 20, 0.25% de Nonidet P40, 25% de Glicerol y 0.05 mg/ml de BSA
Control 1 de VPH	C1 (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	1000 copias/µl de ADN del VPH tipo 51 clonado y 3000 copias/µl de ADN del gen de la histona humana 2 clonado en el ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA
Control 2 de VPH	C2 (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	1000 copias/µl de ADN del VPH tipo 18 clonado y 3000 copias/µl de ADN del gen de la histona humana 2 clonado en el ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA
Control 3 de VPH	C3 (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	1000 copias/µl de ADN del VPH tipo 16 clonado y 3000 copias/µl de ADN del gen de la histona humana 2 clonado en el ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA
Control negativo	NTC (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Seguridad y precauciones de manipulación

1. Deben emplearse precauciones de seguridad universales para el manejo de tejidos o líquidos humanos. Las muestras deben desecharse según las normas locales.

2. Los componentes del producto (residuos o empaque del producto) pueden considerarse desechos de laboratorio. Deseche los reactivos no utilizados y desperdicios según las normas federales, estatales y locales aplicables.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Almacene todos los reactivos entre -30 °C y -15 °C.
- No use reactivos pasada la fecha de vencimiento indicada en la parte externa del paquete.
- No almacene en un congelador sin escarcha.
- Proteja de la luz.
- Antes de usar, saque los reactivos del congelador y déjelos al menos 30 minutos a temperatura ambiente o hasta que la inspección visual indique que no hay material congelado presente.
- Agite con vórtex los reactivos antes de usarlos.
- Third Wave Technologies no recomienda más de seis (6) ciclos de congelamiento y descongelamiento para los reactivos de las pruebas de VPH de alto riesgo Cervista™.

REACTIVOS Y MATERIALES ADICIONALES

El software Invader Call Reporter™ es un componente necesario de esta prueba de diagnóstico in vitro. Se proporciona este software una vez con la compra inicial de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y, posteriormente, con el lanzamiento de actualizaciones del software.

El kit de extracción de ADN Genfind™ es accesorio a la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™. Comuníquese con Third Wave Technologies para solicitar el kit de extracción de ADN Genfind™ (REF 95-449).

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

Materiales fungibles

- Puntas de pipetas, con barrera de filtro y sin nucleasa
- Placas de polipropileno de 96 pocillos
- Sellador de placa transparente
- Aceite mineral para biología molecular
- Tubos estériles de 2 ml de polipropileno y tapas roscadas

Equipos

- Pipetas
- Agitador vórtex

- Lector de placa de fluorescencia (consulte la Tabla 3)
- PC de escritorio con sistema operativo Microsoft® Windows® XP con Microsoft® Excel® y el software Adobe® Reader®.
- Termociclador u horno con capacidad para mantener temperaturas de reacción adecuadas.

OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA REALIZACIÓN DE ANÁLISIS

Las muestras cervicouterinas deben obtenerse en la solución PreservCyt®, el sistema de conservación de la prueba de Papanicolaou ThinPrep®, mediante un dispositivo tipo brocha (p. ej., la brocha Rovers Cervex®, Wallach Papette®) o una brocha/espátula para análisis cervicouterino.

Para la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, las muestras cervicouterinas pueden almacenarse a temperatura ambiente (de 20 °C a 30 °C) en la solución PreservCyt® hasta 18 semanas antes de realizar la prueba. Las muestras de la solución PreservCyt no pueden congelarse.

Debe extraerse ADN de las muestras de PreservCyt® mediante el kit de extracción de ADN Genfind™ **(**REF 95-449**)**.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Nota: extraiga ADN de las muestras cervicouterinas obtenidas en solución PreservCyt® mediante el kit de extracción de ADN Genfind™ **(**REF 95-449**)** antes de comenzar el procedimiento de reacción.

Procedimiento de reacción

1. Agregue 10 *µ*l del ADN de cada control y de cada muestra en tres pocillos de una placa de 96 pocillos como se indica en el diseño de la placa de la prueba (consulte la Figura 2).

	Mez-cla 1	**Mez-cla 2**	**Mez-cla 3**	**Mez-cla 1**	**Mez-cla 2**	**Mez-cla 3**	**Mez-cla 1**	**Mez-cla 2**	**Mez-cla 3**	**Mez-cla 1**	**Mez-cla 2**	**Mez-cla 3**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	C1	C1	C1	S5	S5	S5	S13	S13	S13	S21	S21	S21
B	C2	C2	C2	S6	S6	S6	S14	S14	S14	S22	S22	S22
C	C3	C3	C3	S7	S7	S7	S15	S15	S15	S23	S23	S23
D	NTC	NTC	NTC	S8	S8	S8	S16	S16	S16	S24	S24	S24
E	S1	S1	S1	S9	S9	S9	S17	S17	S17	S25	S25	S25
F	S2	S2	S2	S10	S10	S10	S18	S18	S18	S26	S26	S26
G	S3	S3	S3	S11	S11	S11	S19	S19	S19	S27	S27	S27
H	S4	S4	S4	S12	S12	S12	S20	S20	S20	S28	S28	S28

Figura 2: Diseño de la placa de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

2. Cubra bien cada pocillo con 20 *µ*l de aceite mineral y utilice cinta para sellar la placa y minimizar la evaporación.
3. Incube las muestras a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador.

4. Mezcle bien los reactivos y las mezclas de reacción de forma constante con anterioridad al uso.
5. Prepare las mezclas de reacción como se indica en la hoja de preparación de la mezcla (impresa del software Invader Call Reporter™) o según los cálculos de la Tabla 2. Prepare una mezcla de reacción para cada una de las tres mezclas de oligonucleótidos de VPH antes de cada uso. La mezcla de reacción preparada debe usarse dentro de los 30 minutos.

Tabla 2: Instrucciones para la preparación de la mezcla de reacción

Reactivo	***µ*l/Reacción**	**N.° de reacciones (muestras y controles (*k*))**	**Volumen total**
Mezcla 1, 2 ó 3 de oligonucleótidos de VPH	8 *µ*l	*k*	=8*k*(1.25) *µ*l
Solución de la enzima Cleavase®	2 *µ*l	*k*	=2*k*(1.25) *µ*l
Volumen total de la mezcla	**10 *µ*l**	***k***	**=10*k*(1.25) *µ*l**

6. Reduzca la configuración de la temperatura del termociclador a 63 °C.
7. Agregue 10 *µ*l de la mezcla de reacción adecuada a cada pocillo que contenga un control o una muestra (consulte la Figura 2), teniendo cuidado de aspirar con la pipeta por debajo del aceite mineral.
8. Incube la placa en una configuración de 63 °C durante 4 horas.

Obtención de datos

1. Lleve siempre la placa a temperatura ambiente antes de realizar la lectura. Si no se puede leer la placa de inmediato, almacénela a una temperatura entre 2 °C y 8 °C (se recomienda leer la placa dentro de las 24 horas de realizada la prueba).
2. Coloque la placa de 96 pocillos (el pocillo A1 debe estar en la esquina superior izquierda) en el recipiente de la placa del lector de la placa de fluorescencia. Quite la cinta que sella la placa.
3. Defina el tipo de placa para configurar las coordenadas y la altura de la sonda para el tipo de placa específico. Guarde las configuraciones.
4. Lea toda la placa. Se requieren dos lecturas independientes: FAM (Excitación = 485 nm, Emisión = 535 nm) y Red (Excitación = 560 nm, Emisión = 612 nm). Para detectar la señal del VPH, debe configurarse el instrumento de manera que pueda detectar primero el fluoróforo del FAM. Para detectar el ADN genómico de la muestra, el instrumento debe configurarse de manera tal que detecte el fluoróforo Red (consulte la Tabla 3).
5. Ajuste la ganancia del lector de fluorescencia de la placa para que esté en el rango dinámico lineal del lector según las instrucciones del fabricante. La ganancia debe establecerse de manera tal que el control negativo (NTC) muestre valores que estén en el rango de fondo del lector, con una RFU mínima de 600. No es necesario que los valores del NTC sean idénticos para las lecturas del FAM y Red.

Tabla 3: Especificaciones/configuraciones del lector de la placa de fluorescencia

Parámetros de medición de etiquetado múltiple	Medición 1 (FAM)	Medición 2 (Red)
Modo de lectura:	Superior	Superior
Longitud de onda/ancho de banda de la excitación:	485/20 nm	560/20 nm
Longitud de onda/ancho de banda de la emisión:	535/25 nm	612/10 nm
Cantidad de destellos:	10	10
Tiempo de integración:	20 µs	20 µs

NOTAS DE PROCEDIMIENTO Y PRECAUCIONES

1. Los laboratorios deben aplicar buenas prácticas de laboratorio y cumplir con todos los requisitos de las reglamentaciones federales, estatales y locales aplicables.
2. Estos componentes han sido probados como una unidad. No intercambie componentes de otras fuentes o de lotes diferentes. No combine los reactivos de diferentes lotes ni de diferentes viales del mismo lote.
3. No use los reactivos después de la fecha de vencimiento.
4. Mezcle bien las muestras, los reactivos y las mezclas de reacción de forma constante.
5. Use puntas de pipetas de barrera en aerosol, estériles, descartables y sin nucleasa para cada adición y transferencia para evitar la contaminación cruzada.
6. Use tubos de propileno descartables sin nucleasa para la preparación de las mezclas de reacción.
7. Verifique que el tipo de placa de 96 pocillos sea compatible con el termociclador específico y el lector de la placa de fluorescencia que se usará antes de comenzar la prueba.
8. Deben agregarse controles en las posiciones designadas en el diseño de la placa de la prueba que aparece en la Figura 2 para que el software Invader Call Reporter™ funcione correctamente.
9. Use aceite mineral nuevo para la configuración de cada reacción (no transfiera estos reactivos nuevamente al contenedor original una vez que los haya aplicado).
10. Consulte el diseño de la placa de la prueba para asegurarse de haber agregado la mezcla correcta en la columna apropiada.
11. Coloque siempre la punta de la pipeta cerca de la parte inferior del pocillo para asegurarse de que la mezcla de reacción se agregue debajo del aceite mineral. Para mezclar, llene y vacíe cuidadosamente la punta de la pipeta de 3 a 5 veces.
12. Debe hacerse un seguimiento del procedimiento de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, los controles de calidad y la interpretación de los resultados para obtener resultados confiables de la prueba.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para cada una de las tres reacciones, se genera un valor señal-ruido (señal de la muestra comparada con la señal del pocillo de la reacción de control negativo). Este valor señal-ruido se denomina valor FOZ (curvatura sobre cero, del inglés *Fold-Over-Zero*). Se genera un resultado final positivo, negativo o indeterminado para cualquier muestra en particular a partir del análisis de tres pocillos de reacción independientes.

La relación entre los valores FOZ del VPH generada por las tres mezclas de reacción determina si una muestra es positiva. El ratio FOZ del VPH se calcula al dividir el valor FOZ del VPH más alto de cualquiera de las tres mezclas de reacción por el valor FOZ del VPH más bajo de las tres. Cuando cualquiera de los valores FOZ es menor que 1, se redondea a 1 para el cálculo del ratio. Si el ratio FOZ del VPH es mayor o igual a 1.525, la muestra es VPH positiva. Sin embargo, en un subconjunto de infecciones mezcladas, los tres pocillos de reacción pueden generar una señal mucho más alta que el fondo. En algunos casos, estas infecciones mezcladas pueden generar señales positivas de intensidades similares en los tres pocillos de reacción y, por lo tanto, un ratio FOZ del VPH menor a 1.525. Para evitar la posibilidad de un resultado negativo falso debido a la condición positiva descrita arriba, se aplica un segundo cálculo de la siguiente manera: cuando el ratio FOZ es menor que 1.525 pero los tres valores FOZ individuales de la reacción son mayores que un segundo valor de corte de 1.93, la muestra es VPH positiva.

Una llamada indeterminada se genera en tres condiciones diferentes 1) cuando el CV porcentual entre el valor FOZ del ADNg es ≥ 25.0% (CV porcentual alto), 2) cuando los tres valores FOZ del VPH son < 0.7 (FOZ del VPH bajo) y 3) cuando un promedio del FOZ del ADNg de una muestra negativa es < 1.5 (ADNg bajo). Una llamada indeterminada es indicadora de una mezcla insuficiente, un error en la medición en pipeta o un ADNg inadecuado en la muestra (consulte la Guía de resolución de problemas).

En la Figura 3 se muestra un resumen del criterio de llamada de muestra descrito arriba.

Terminología

FOZ del VPH: para cada mezcla de oligonucleótidos del VPH, la señal del FAM de la muestra dividida por la señal del FAM del control negativo.

Ratio FOZ del VPH: la FOZ del VPH más alta de las tres mezclas de oligonucleótidos del VPH se divide por la más baja (normalizada a 1.0 si el valor FOZ es menor).

FOZ promedio del ADNg: el valor promedio determinado a partir de los tres valores FOZ del ADN genómico obtenidos de cada una de las tres mezclas de reacción, calculado al dividir la señal del Red de la muestra por la señal del Red del control negativo.

CV porcentual del FOZ del ADNg: el coeficiente porcentual de la variación para los valores FOZ del ADNg generados por las tres mezclas de oligonucleótidos de VPH.

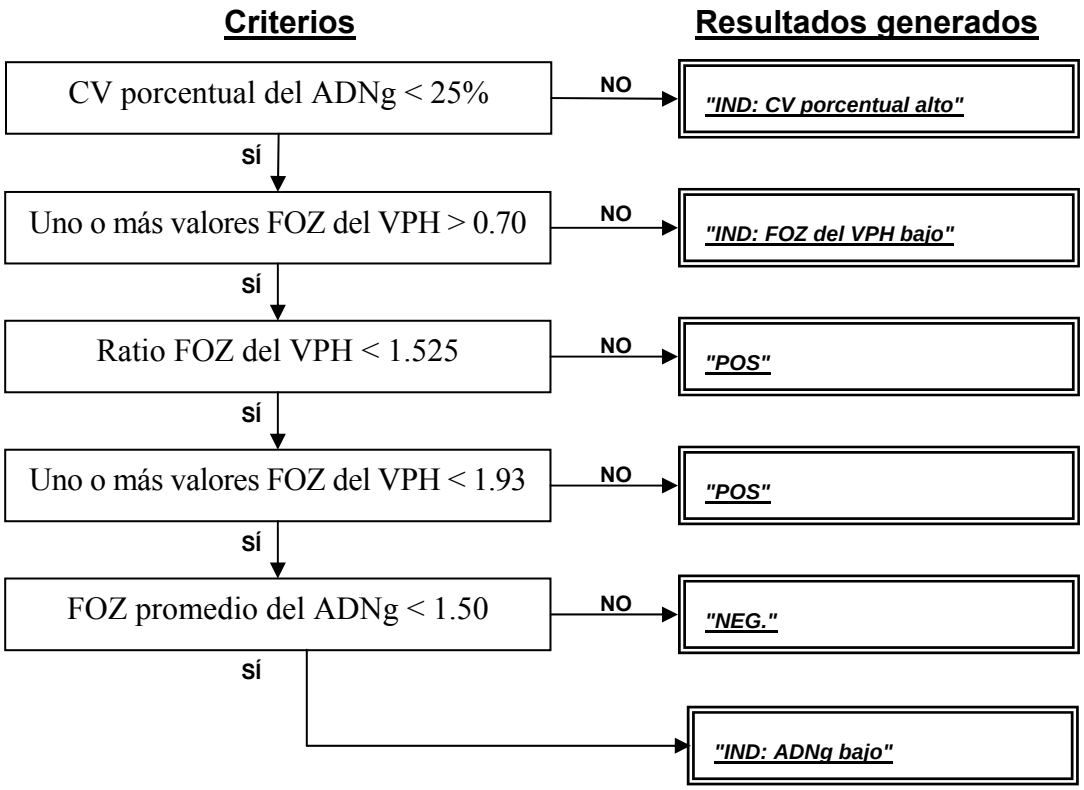


Figura 3: Criterios de llamadas de la muestra ordenados de arriba a abajo

Nota: la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no requiere el uso de una zona equívoca o de reiteración de la prueba.

Tabla 4: Interpretación de los resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

Resultado de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Informe del resultado	Interpretación de las pacientes con citología ASC-US	Interpretación de las pacientes ≥30 años de edad con citología de NILM*
POS	Tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ó 68 detectados	Probabilidad baja pero incrementada de que la CIN de alto grado subyacente se detecte en una colposcopia. La bibliografía clínica sugiere que es posible el desarrollo de una enfermedad de alto grado. [2,3,7,18]	Baja probabilidad de CIN maligna subyacente. La infección por VPH puede ser transitoria, estar en proceso de resolución o ser persistente.
NEG.	Tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 no detectados	Baja probabilidad de CIN2 ó 3 subyacentes o cáncer. Los resultados no están diseñados para impedir que las mujeres procedan a la realización de una colposcopia.	Muy baja probabilidad de CIN maligna subyacente o cáncer. Los resultados no excluyen infecciones por VPH futuras ni anomalías citológicas con CIN2-3 subyacentes o cáncer.
IND: CV porcentual alto**	Indeterminado	Estado desconocido del VPH de alto riesgo	
IND: ADNg bajo**			

***** Según las pautas consensuadas en 2006[18], a partir de los 30 años las mujeres con citología de mayor gravedad que la de ASC-US (que incluye ASC-H, LSIL o superior) deben realizarse una colposcopia independientemente de los resultados de la prueba de VPH.

**Los ensayos clínicos sobre la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ demostraron que el índice indeterminado fue de 0.54% (intervalo de confianza del 95%: 0.32%-0.86%) en todas las muestras de las pacientes analizadas.

CONTROL DE CALIDAD

Control interno

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ incluye un control interno que determina la cantidad relativa de ADN de la muestra en cada reacción. El control interno, el gen de la histona humana 2, se mide mediante una señal de color rojo fluorescente, que se encuentra sobre un valor de corte derivado empíricamente en cada reacción. La medida de este objetivo funciona como mecanismo de control de calidad para confirmar que un resultado negativo no se debe a una muestra insuficiente. El objetivo de control interno también funciona como medida de procesamiento para garantizar que el procedimiento de la prueba se haya realizado correctamente.

Controles externos

Control negativo

El control negativo debe realizarse en cada placa de análisis y los resultados deben cumplir los siguientes criterios para que las muestras de la placa sean válidas. Si no cumplen estos criterios, las muestras y los controles de esa placa no serán válidos y deberán repetirse (consulte el resumen de la Tabla 5):

1. La señal mínima para cada una de las tres mezclas debe ser superior o igual a 600 RFU (≥ 600).
2. El CV porcentual de la señal de VPH promedio de las tres mezclas debe ser menor que 25.0% (< 25.0%).
3. El CV porcentual de la señal de ADNg promedio de las tres mezclas debe ser menor que 25.0% (< 25.0%).

Tabla 5: Criterios de control negativo

Resultado	Señal mín. de VPH	Señal mín. de ADNg	CV porcentual mínima (VPH y ADNg)
Válido	600	600	24.9%

Controles positivos

Los controles de VPH (Controles 1 a 3 de VPH) deben realizarse en cada placa de análisis y los resultados deben cumplir los siguientes criterios para que la prueba sea válida. Si los controles no cumplen estos criterios, las muestras de esa placa tampoco serán válidas y deberán repetirse las pruebas (consulte el resumen de la Tabla 6):

1. Un ratio FOZ del VPH se determina dividiendo el valor FOZ de VPH más alto de las tres mezclas de reacción por el más bajo (normalizado a 1.0 si es menor). El control 1 de VPH debe presentar un valor positivo de FOZ del VPH (≥ 1.525) sólo para la mezcla 1 de oligonucleótidos del VPH, el control 2 del VPH debe mostrar un valor positivo de FOZ del VPH (≥ 1.525) sólo para la mezcla 2 de oligonucleótidos del VPH y el control 3 del VPH debe generar un valor positivo de FOZ del VPH (≥ 1.525) sólo para la mezcla 3 de oligonucleótidos del VPH.
2. La media de FOZ del ADNg de las tres mezclas debe ser superior o igual a 1.50 (≥ 1.50) o el control no será válido para el ADNg bajo.

3. El CV porcentual del valor FOZ del ADNg medio de las tres mezclas debe ser menor que 25.0% (< 25.0%).

Tabla 6: Criterios de control del VPH

Control	Resultado	Ratio FOZ del VPH	Mezcla FOZ positiva	FOZ promedio del ADNg	CV porcentual FOZ del ADNg
Control 1 de VPH	Control válido	≥ 1.525	Sólo mezcla 1	≥ 1.50	< 25.0%
Control 2 de VPH	Control válido	≥ 1.525	Sólo mezcla 2	≥ 1.50	< 25.0%
Control 3 de VPH	Control válido	≥ 1.525	Sólo mezcla 3	≥ 1.50	< 25.0%

Nota: es posible analizar controles externos adicionales según las pautas o requisitos de las reglamentaciones o de las organizaciones de acreditación locales, estatales o de cada país. Los análisis de controles externos adicionales deben realizarse en pocillos designados para las muestras de las pacientes según el diseño de la placa.

Verificación de la prueba

1. Los resultados de la muestra son válidos si los controles positivos y negativos producen resultados correctos. Si el control negativo o alguno de los resultados de los controles positivos no son válidos, los resultados de las muestras en la placa no serán válidos y deberán repetirse las pruebas. Consulte las secciones de Resolución de problemas de este prospecto y el Manual del usuario del software Invader Call Reporter™.
2. Debe cumplirse con todos los requisitos de control de calidad estipulados por las reglamentaciones locales, estatales y federales, así como con los requisitos de acreditación correspondientes.

LIMITACIONES

1. La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ detecta el ADN de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Esta prueba no detecta el ADN de los tipos de VPH de bajo riesgo (p. ej., 6, 11, 42, 43, 44) ya que el análisis para estos tipos de VPH no es de utilidad clínica.[18]
2. La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ muestra una reactividad cruzada con dos tipos de VPH de riesgo desconocido. Se observó un resultado de VPH positivo con 5000 copias/reacción de VPH tipo 67 y 50,000 copias/reacción de VPH tipo 70.
3. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por VPH, ya que niveles muy bajos de infección o errores en la muestra pueden producir resultados negativos falsos.
4. La prueba ha sido validada para su uso sólo con muestras citológicas cervicouterinas obtenidas en la solución PreservCyt® mediante una brocha Rovers Cervex®, Wallach Papette® o brocha/espátula endocervical.
5. El rendimiento de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se estableció exclusivamente mediante el uso de ADN extraído con el Kit de extracción de ADN Genfind™.

6. El rendimiento de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se estableció mediante el uso de las muestras de PreservCyt® para citología cervicouterina procesadas en ThinPrep 2000. No se ha establecido mediante otros procesadores.
7. El rendimiento de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no se ha establecido adecuadamente para las pacientes vacunadas contra el VPH.
8. Se observó interferencia en las muestras cervicouterinas contaminadas con niveles altos (2%) de jalea anticonceptiva o cremas antimicóticas cuando se aisló el ADN con el Kit de extracción de ADN de Genfind™. En estas condiciones, pueden obtenerse resultados falsos negativos.
9. La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para los virus de papiloma humano de tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 no se recomienda para la evaluación de la sospecha de abuso sexual.
10. La prevalencia de la infección por VPH en una población puede afectar el rendimiento. Los valores predictivos positivos disminuyen al analizar poblaciones con baja prevalencia o pacientes sin riesgo de infección.
11. La infección por VPH no es un indicador de HSIL citológica o CIN de alto grado subyacente ni implica que se manifestará una CIN2-3 o cáncer. La mayoría de las mujeres infectadas por uno o más tipos de VPH de alto riesgo no desarrollan CIN2-3 ni cáncer.
12. Un resultado negativo de la prueba de VPH de alto riesgo no excluye la posibilidad de HSIL citológicas, CIN2-3 subyacentes o cáncer en el futuro.
13. Las muestras de la solución PreservCyt® que contienen volúmenes menores a 2 ml después de la preparación de los portaobjetos de la prueba de Papanicolaou con ThinPrep se consideran inadecuadas para la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™.

RESULTADOS PREVISTOS

Prevalencia del VPH de alto riesgo

La prevalencia informada de la infección por VPH en mujeres varía dentro de un amplio espectro, de un 14% a más de un 90%.[20] Existen varios factores que pueden afectar a la prevalencia del VPH entre las poblaciones de pacientes debido a la heterogeneidad de ubicaciones geográficas, edades, cantidad de parejas sexuales, antecedentes de citología cervicouterina anómala, junto a las diferencias de las técnicas de muestreo y los métodos de análisis, y la naturaleza intermitente de la infección. El estudio clínico prospectivo en centros múltiples de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ inscribió a mujeres de 89 clínicas de 23 estados de los EE.UU. que produjeron una población de pacientes demográficamente diversa. La Tabla 7 muestra los resultados de prevalencia de cuatro Centros de estudios clínicos que realizaron la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para dicho estudio. Las muestras de todos los sitios de inscripción se distribuyeron aleatoriamente entre los centros de prueba.

Tabla 7: Prevalencia del VPH de alto riesgo en los Centros de prueba para los estudios clínicos

	Población con ASC-US		Población con NILM	
Centro	Pacientes a las que se realizó la prueba	Índice de VPH de alto riesgo positivo	Pacientes a las que se realizó la prueba	Índice de VPH de alto riesgo positivo
1	709	60.5% (429/709)	1007	18.9% (190/1007)
2	312	57.1% (178/312)	225	15.6% (35/225)
3	247	53.8% (133/247)	721	18.7% (135/721)
4	79	36.7% (29/79)	13	23.1% (3/13)
Total	1,347	57.1% (769/1347)	1,966	18.5% (363/1966)

La Tabla 8 muestra la prevalencia del VPH de alto riesgo entre pacientes con citología ASC-US estratificada según la edad.

Tabla 8: Prevalencia del VPH de alto riesgo según la edad

Edad	Población con ASC-US	Edad	Población con NILM
18 < 21	77.8% (105/135)	30 < 40	21.4% (132/618)
21 < 30	71.7% (352/491)	40 < 50	17.5% (118/674)
30 < 39	55.3% (167/302)	50 < 60	16.2% (79/489)
≥ 39	34.6% (145/419)	≥ 60	18.4% (34/185)
Todos	57.1% (769/1347)	Todos	18.5% (363/1966)

La Tabla 9 muestra la prevalencia del VPH de alto riesgo independientemente de la citología, como se informó en varios estudios en mujeres en distintas poblaciones de EE.UU.

Tabla 9: Prevalencia del VPH de alto riesgo en varias poblaciones de EE.UU.

Ubicación	Fecha de publicación	Tamaño total del estudio	Rango etario	Prevalencia del VPH (%)
Nuevo México[21]	2001	3,863	18 - 40	26.7%
Población civil de EE.UU.[22]	2007	1,921	14 - 59	15.2%
Oregón[23]	2003	20,156	16 - 94	16.3%
Arizona[24]	2001	988	15 - 79	13.9%

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD CLÍNICA Y ESPECIFICIDAD PARA EL ANÁLISIS DE PACIENTES CON RESULTADOS DE CITOLOGÍA CERVICOUTERINA DE ASC-US PARA DETERMINAR LA NECESIDAD DE DERIVACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE UNA COLPOSCOPIA

Se realizó un estudio clínico prospectivo en centros múltiples para evaluar el rendimiento de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para el análisis de pacientes con resultados de citología de ASC-US para determinar la necesidad de una derivación para realizar una colposcopia. Todas las características de rendimiento clínico se establecieron mediante muestras citológicas líquidas tratadas con ThinPrep. Las muestras cervicouterinas ThinPrep iniciales se clasificaron siguiendo el sistema Bethesda 2001. Todas las mujeres (a partir de los 18 años) con resultados citológicos de ASC-US durante los procedimientos de prueba de detección de cáncer cervicouterino de rutina fueron invitadas a participar en el estudio antes de conocer el estado de VPH. Para las mujeres que dieron consentimiento, se obtuvieron posteriormente muestras ThinPrep de ASC-US residual iniciales para la realización de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™. Todas las pacientes que dieron su consentimiento para la realización del estudio fueron sometidas a colposcopias. Los

investigadores y las pacientes estaban cegadas al estado de VPH de las pacientes hasta que finalizaron los procedimientos colposcópicos, para evitar sesgos. Las muestras histológicas dirigidas colposcópicamente fueron examinadas por patólogos que también desconocían la condición de VPH de las pacientes. 1,514 mujeres a partir de los 18 años* con resultados de ASC-US se inscribieron finalmente en el estudio realizado en 89 clínicas de los Estados Unidos.

El rendimiento clínico de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se comparó con los resultados de la colposcopia y la histología. Las muestras de las biopsias se obtuvieron de mujeres con citología de ASC-US, según lo requieren las pautas de cuidados estándar en cada clínica participante. Los resultados histológicos consensuados brindados por un panel de revisión de patólogos central fueron el "criterio de referencia" para la determinación de la presencia o ausencia de la enfermedad. En ausencia de datos histológicos, la falta de lesiones cervicouterinas visibles mediante la colposcopia y de biopsia se equiparó a la ausencia de enfermedad.

Hubo 1,347 pacientes con ASC-US con estado de la enfermedad (histología central o colposcopia negativa) y resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ conocidos. En la Tabla 10, se muestra una comparación entre los resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y la colposcopia/histología central. El rendimiento clínico de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se resume en las Tablas 11, 12 y 13.

Tabla 10: Resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en comparación con los resultados de la colposcopia/histología central entre mujeres con citología ASC-US

Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	**Colposcopia neg. sin biopsia**	**Histología central**				**Total**
		No presenta CIN	**CIN1**	**CIN2**	**≥ CIN3**	
VPH de alto riesgo positivo	164	389	152	42	22	769
VPH de alto riesgo negativo	214	314	30	5	0	563
VPH de alto riesgo indeterminado	4	11	0	0	0	15
Total	382	714	182	47	22	1347

Tabla 11: Resumen de rendimiento clínico de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en comparación con los resultados de la colposcopia/histología central (≥ CIN2) entre mujeres con citología ASC-US.

Sensibilidad	92.8% (64/69)	Intervalo de confianza del 95%: (84.1% - 96.9%)
Especificidad	44.2% (558/1263)	Intervalo de confianza del 95%: (41.5% - 46.9%)
PPV	8.3% (64/769)	Intervalo de confianza del 95%: (7.6% - 8.9%)
NPV	99.1% (558/563)	Intervalo de confianza del 95%: (98.1% - 99.6%)
Prevalencia de la enfermedad	5.2% (69/1332)	

Nota: entre las mujeres con citología ASC-US, el 1.1% (15 de 1347) obtuvo resultados indeterminados en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ con un intervalo de confianza del 95%: 0.7% a 1.8%

* Este estudio se llevó a cabo antes de la implementación de las pautas[18] que recomiendan restringir las pruebas de VPH para ASC-US a mujeres a partir de los 21 años de edad.

Tabla 12: Resumen de rendimiento clínico de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en comparación con los resultados de la colposcopia/histología central (≥ CIN3) entre mujeres con citología ASC-US.

Sensibilidad	100% (22/22)	Intervalo de confianza del 95%: (85.1% - 100%)
Especificidad	43% (563/1310)	Intervalo de confianza del 95%: (40.3% - 45.7%)
PPV	2.9% (22/769)	Intervalo de confianza del 95%: (2.4% - 3.0%)
NPV	100% (563/563)	Intervalo de confianza del 95%: (99.4% - 100%)
Prevalencia de la enfermedad	1.7% (22/1332)	

Nota: entre las mujeres con citología ASC-US, el 1.1% (15 de 1347) obtuvo resultados indeterminados en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ con un intervalo de confianza del 95%: 0.7% a 1.8%
Los resultados histológicos de la CIN2 (47) se consideran negativos para la enfermedad (≥ CIN3) en esta tabla.

Tabla 13: Rendimiento clínico de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ estratificado por edades en comparación con los resultados de la colposcopia/histología central (≥ CIN2) entre mujeres con citología ASC-US.

Edad: 18 a <21	Histología central ≥ CIN2		
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Negativo	Positivo	Total
Positivo	96	9	105
Negativo	28	0	28
Total	124	9	133
Prevalencia de la enfermedad:	6.8% (9/133)	Intervalo de confianza del 95%	
Sensibilidad:	100% (9/9)	70.1%	100.0%
Especificidad:	22.6% (28/124)	16.1%	30.7%
PPV:	8.6% (9/105)	4.0%	15.70%
NPV:	100% (28/28)	87.7%	100.0%
Edad: 21 a <30	Histología central ≥ CIN2		
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Negativo	Positivo	Total
Positivo	321	31	352
Negativo	136	0	136
Total	457	31	488
Prevalencia de la enfermedad:	6.4% (31/488)	Intervalo de confianza del 95%	
Sensibilidad:	100% (31/31)	89.0%	100.0%
Especificidad:	29.8% (136/457)	25.8%	34.1%
PPV:	8.8% (31/352)	6.1%	12.27%
NPV:	100% (136/136)	97.3%	100.0%
Edad: 30 a <39	Histología central ≥ CIN2		
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Negativo	Positivo	Total
Positivo	157	10	167
Negativo	126	3	129
Total	283	13	296
Prevalencia de la enfermedad:	4.4% (13/296)	Intervalo de confianza del 95%	
Sensibilidad:	76.9% (10/13)	49.7%	91.8%
Especificidad:	44.5% (126/283)	38.8%	50.3%
PPV:	6.0% (10/167)	2.9%	10.74%
NPV:	97.7% (126/129)	93.4%	99.5%
Edad: a partir de los 39 años	Histología central ≥ CIN2		
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Negativo	Positivo	Total
Positivo	131	14	145
Negativo	268	2	270
Total	399	16	415
Prevalencia de la enfermedad:	3.9% (16/415)	Intervalo de confianza del 95%	
Sensibilidad:	87.5% (14/16)	64.0%	96.5%
Especificidad:	67.2% (268/399)	62.4%	71.6%
PPV:	9.7% (14/145)	5.4%	15.67%
NPV:	99.3% (268/270)	97.3%	99.9%

Existe una cantidad de variables clave que se sabe influyen en las características de rendimiento de cualquier prueba de VPH en un estudio clínico. Éstas incluyen, entre otras, las técnicas de muestreo cervicouterino, la calidad de los resultados citológicos, la edad de la población analizada, la prevalencia de la enfermedad, los métodos de determinación de la enfermedad y los métodos de interpretación histológica. Dada la cantidad de variables presentes durante la prueba de VPH de rutina en centros clínicos múltiples, vale la pena aclarar que muchos de los resultados obtenidos del estudio clínico de TWT son similares a los presentados en las condiciones de estudio controladas descritas en el Estudio de priorización de ASC-US/LSIL (ALTS).[6,8,28] En la Tabla 14, se muestra una comparación del diseño del estudio, la prevalencia de la enfermedad y las características de rendimiento clínico del estudio de TWT y ALTS. La diferencia en los índices de ≥ CIN2 observados entre los dos estudios puede reflejar diferencias poblacionales como también diferencias en la determinación de la enfermedad.

Tabla 14: Comparación del ensayo clínico de TWT y el ALTS[6,8]

Criterio	ALTS	TWT
Cantidad de centros de inscripción/estados	4 / 4	89 / 22
Edad media de las pacientes	29	33
Pacientes a las que se realizó una colposcopia	1149[a]	1347[b]
Pacientes sin lesiones; no se realizó biopsia (%)	25%	28%
Pacientes sin lesiones patológicas en la biopsia (%)	49%	53%
Pacientes con ≥ CIN1 (%)	15%	14%
Pacientes con ≥ CIN2 (%)	11%	5%
Índice de detección de ≥ CIN2	96%	93%
Índice de detección de ≥ CIN3	96%	100%
Valor predictivo negativo de ≥ CIN2	98.9%	99.1%
Valor predictivo negativo de ≥ CIN3	99.5%	100.0%
Índice de derivación a colposcopia	57%	57%[c]
Concordancia de PCR	82.7%	86.1%

[a] Fase de colposcopia inmediata de ALTS
[b] Cantidad de pacientes con estado de enfermedad conocido y resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™
[c] El índice de derivación en mujeres a partir de los 30 años de edad fue del 43%

EN MUJERES A PARTIR DE LOS 30 AÑOS DE EDAD, EL RENDIMIENTO DE LA PRUEBA DE VPH DE ALTO RIESGO CERVISTA™ COMO AUXILIAR DE LA CITOLOGÍA CERVICOUTERINA, PARA AYUDAR A GUIAR EL TRATAMIENTO DE LAS PACIENTES

Se inició un estudio longitudinal de 3 años después de la aprobación de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para avalar su uso como auxiliar de la citología cervicouterina, en comparación con la citología cervicouterina sola. El diseño del estudio se describe debajo, junto con los datos analíticos preliminares obtenidos de la población del estudio en el momento de la inscripción. Este estudio analítico se usó para la evaluación de la coincidencia de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ con un comparador compuesto de VPH entre las poblaciones ≥30 con ASC-US y NILM. La aprobación de esta indicación se otorga antes de la finalización de los estudios longitudinales a la luz de los resultados de los estudios analíticos. Además, los datos consistentes obtenidos de varios estudios de cohortes de secciones cruzadas y prospectivos que se realizaron mediante una variedad de métodos de muestreo de células y con el uso de una variedad de métodos de prueba de ADN del VPH (aprobados por la FDA y aptos para uso en investigación) brindaron pruebas

sólidas de que un resultado negativo de la prueba de ADN del VPH implica un riesgo muy bajo de prevalencia o de comienzo de CIN2-3 ó de cáncer cuando los resultados de la citología cervicouterina son normales.[5,16,23,25]

Descripción del estudio clínico de NILM ≥ 30

Aproximadamente 2,000 pacientes que cumplían los requisitos y con resultados de citología cervicouterina normales (NILM) se han inscripto en 26 centros clínicos activos en los Estados Unidos. Se anticipa que no menos de 1,000 pacientes contarán con datos de seguimiento de 3 años. El índice de retención de pacientes al final del primer año de seguimiento fue de aproximadamente un 80%. Durante 3 años, se realizará un seguimiento de las pacientes, que deberán acudir a consultas anuales para la realización de análisis. En cada consulta de seguimiento, se realiza una prueba citológica cervicouterina. Se realizará una colposcopia a las mujeres que presentan resultados ASC-US o citología de mayor grado y subsiguientemente una biopsia, de ser necesario. El análisis de estos datos se centrará en el riesgo a los tres años de manifestar una enfermedad cervicouterina asociada con las pacientes con diagnósticos positivos de NILM en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en comparación con los diagnósticos negativos de la prueba en el momento de la inscripción (T_0). Los resultados positivos y negativos de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en el T_0 se compararán con la presencia o la ausencia de (a) ≥ CIN2 y (b) ≥ CIN3 en todo el estudio. La presencia de CIN2, CIN3 o cáncer cervicouterino se determinará mediante una histología central. Los resultados negativos se definirán por la colposcopia a menos que los resultados histológicos centrales estén disponibles para dejar sin efecto una indicación colposcópica inicial positiva. Toda interpretación citológica será realizada por un panel de revisión de patólogos central.

Coincidencia con un comparador compuesto entre las poblaciones de ≥ 30 con ASC-US y NILM

El rendimiento analítico de la prueba se midió en relación con un comparador compuesto de un análisis de VPH y la PCR/Secuenciación aprobados por la FDA. El comparador compuesto se definió como: positivo si los resultados del análisis de VPH y la PCR/Secuenciación aprobados por la FDA fueron positivos; negativo si los resultados fueron negativos; e indeterminado si los resultados fueron discordantes. Para este estudio analítico, se utilizó un subconjunto aleatorio de las mismas muestras obtenidas durante el estudio clínico para las poblaciones con ASC-US (durante un período de inscripción de 17 meses) y las evaluaciones longitudinales posteriores a la aprobación al inicio del estudio para poblaciones ≥ 30 con NILM (recolectadas durante un período de inscripción de 15 meses), respectivamente.

Para la PCR/Secuenciación, las muestras de ADN se multiplicaron mediante cebadores consensuados para el gen L1 del VPH. También se multiplicó una porción del gen de la beta-globina humana como control interno. Se usaron amplicones purificados como plantillas en las reacciones de secuenciación múltiple para 14 tipos de VPH de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Los datos de secuenciación se analizaron mediante distintos software de alineación de secuencias. El análisis de VPH aprobado por la FDA se realizó según la clasificación aprobada. Los resultados del análisis compuesto se muestran en las Tablas 15 y 16 que están a continuación.

Tabla 15: Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para la población con ASC-US vs. Comparador compuesto (Secuenciación de PCR y prueba de VPH aprobada por la FDA)

		Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™		Total
		Positivo	Negativo	
Compuesto Resultado de alto riesgo	Positivo	536	25	561
	Negativo	44	370	414
	Indeterminado	60	64	124
Total		640	459	1099

Coincidencia porcentual positiva: 95.5% (536/561) con intervalo de confianza del 95%: (93.5% - 97.1%)
Coincidencia porcentual negativa: 89.4% (370/414) con intervalo de confianza del 95%: (86.0% - 92.2%)

Tabla 16: Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ de la población ≥ 30 con NILM vs. Comparador compuesto (Secuenciación de PCR y prueba de VPH aprobada por la FDA)

		Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™		Total
		Positivo	Negativo	
Compuesto Resultado de alto riesgo	Positivo	17	1	18
	Negativo	67	357	424
	Indeterminado	10	9	19
Total		94	367	461

Coincidencia porcentual positiva: 94.4% (17/18) con intervalo de confianza del 95%: (72.7% - 99.9%)
Coincidencia porcentual positiva: 84.2% (357/424) con intervalo de confianza del 95%: (80.4% - 87.5%)

Sensibilidad analítica

El ADN plasmídico del VPH clonado, en representación de los 14 tipos de VPH detectados por la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, fue analizado para determinar la sensibilidad analítica individual para cada tipo específico.

Nueve muestras de ADN caracterizado como VPH negativo aisladas de las muestras cervicouterinas se analizaron en réplicas de ocho (9 muestras por 8 réplicas/muestra = 72 puntos de datos) para determinar el límite del blanco (LoB). El valor LoB (ratio FOZ del FAM) fue = 1.20.

El Límite de detección (LoD) es la cantidad más baja de analito necesaria para que la muestra tenga el resultado "VPH detectado" (FOZ > 1.20) al menos el 95% de las veces (los resultados de la prueba están por encima del valor de corte analítico el 95% de la veces). Los valores del Límite de detección (LoD) individual se calcularon para los 14 tipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Cada ADN plasmídico del VPH se analizó en concentraciones de 7500, 5000, 2500 y 1250 copias por reacción, cada una en un fondo de tres concentraciones de ADN genómico aisladas de la línea de células VPH negativas (10 ng, 100 ng y 1 μg por reacción). Todas las muestras positivas se analizaron en réplicas de ocho que resultaron en 24 réplicas por concentración de ADN plasmídico del VPH.

El LoB y el LoD se evaluaron según el documento EP17-A del CLSI.[26]

En la Tabla 17, se indica el Límite de detección para cada tipo de VPH. Los límites se describen en términos del ratio FOZ del FAM y como un rango de cantidad de copias. Los valores LoD de cantidad de copias por reacción se informaron como el rango de cantidad de copias en el que el 95% de los ratios FOZ del FAM observadas estaban por encima del LoB.

Tabla 17: Resumen de sensibilidad analítica de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

Tipo de ADN del VPH	LoD (Cantidad de copias/reacción)	LoD (Ratio FOZ del FAM)	Desviación estándar
16	1250-2500	1.34	0.08
18	1250-2500	1.34	0.08
31	1250-2500	1.30	0.06
33	2500-5000	1.31	0.07
35	5000-7500	1.34	0.09
39	2500-5000	1.30	0.06
45	1250-2500	1.31	0.06
51	2500-5000	1.35	0.09
52	1250-2500	1.28	0.04
56	1250-2500	1.37	0.10
58	2500-5000	1.35	0.09
59	2500-5000	1.35	0.09
66	2500-5000	1.30	0.06
68	2500-5000	1.30	0.06
Media		**1.324**	**0.074**

Además del estudio de sensibilidad analítica descrito arriba, se prepararon las diluciones de la línea de células para evaluar el rendimiento de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ mediante dos líneas de células VPH positivas (HeLa y SiHa) diluidas con una línea de células VPH negativas (Jurkat) en una concentración final de 100,000 células/ml en el medio PreservCyt®. Mediante el uso del valor de corte clínico del ratio FOZ del FAM de 1.525, las concentraciones que estaban por encima del valor de corte clínico, el 95% de las veces eran de aproximadamente 2,500 células/ml para las células SiHa y de 1,000 células/ml para las células HeLa.

Valor de corte clínico para la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

El valor de corte clínico se evaluó según el enfoque descrito en un documento de referencia[27] sobre el cálculo de sensibilidad y especificidad sin sesgo. En resumen, los valores de corte se evaluaron según los objetivos de sensibilidad clínica especificados previamente para la detección de histología $\geq$ CIN2 que estaban correspondientemente cerca de los valores de corte definidos previamente en los estudios analíticos. Según estos criterios, se seleccionó un valor de corte del ratio FOZ del VPH de ≥ 1.525 o un valor FOZ del VPH mínimo de ≥ 1.93 para las tres mezclas de reacción como valores de corte para la prueba.

Precisión

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se demostraron en un estudio de 21 días con tres operadores alternantes, cada uno de los cuales realizó dos series por día en conjuntos de equipos asignados individualmente. Cada análisis consistió en cuatro placas. Se usaron diseños de placas diferentes para los análisis en cada día. Las muestras analizadas dentro de cada serie

incluyeron muestras de ADN genómico aisladas de dos líneas de células VPH positivas (SiHa, tipo 16 y HeLa, tipo 18) y una línea de células VPH negativo (Jurkat) y muestras artificiales que contienen ADN plasmídico de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 ó VPH68 y ADN de células Jurkat. Cada muestra fue comprobada en duplicados en tres concentraciones.

La cantidad total de mediciones por muestra fue de 84 (21 días, 2 análisis por día, 2 réplicas por serie).

Tabla 18: Resumen estadístico del estudio de precisión de 21 días

Objetivo	Copias/Reacción[a] o Células/ml[b]	N	Media del ratio FOZ del VPH	Intraanálisis (repetibilidad)		Interserial		Interdiaria		Interoperador		Total (precisión intralaboratorio)	
				DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%
VPH 16	5,000[a]	84	2.827	1.052	37%	0.694	25%	0.529	19%	0.074	3%	1.048	37%
	10,000[a]	84	3.976	0.136	3%	0.263	7%	0.276	7%	0.281	7%	0.316	8%
VPH 18	5,000[a]	84	2.236	0.280	13%	0.230	10%	0.176	8%	0.089	4%	0.304	14%
	10,000[a]	84	3.182	0.105	3%	0.153	5%	0.092	3%	0.054	2%	0.160	5%
VPH 31	5,000[a]	84	2.199	0.098	4%	0.142	6%	0.119	5%	0.079	4%	0.174	8%
	10,000[a]	84	3.032	0.123	4%	0.178	6%	0.159	5%	0.082	3%	0.219	7%
VPH 33	5,000[a]	84	1.840	0.319	17%	0.261	14%	0.214	12%	0.121	7%	0.362	20%
	10,000[a]	84	2.622	0.100	4%	0.236	9%	0.164	6%	0.102	4%	0.230	9%
VPH 35	5,000[a]	84	1.640	0.226	14%	0.249	15%	0.157	10%	0.052	3%	0.280	17%
	10,000[a]	84	2.339	0.077	3%	0.149	6%	0.084	4%	0.070	3%	0.142	6%
VPH 39	5,000[a]	84	2.078	0.061	3%	0.124	6%	0.081	4%	0.050	2%	0.116	6%
	10,000[a]	84	2.986	0.100	3%	0.259	9%	0.139	5%	0.055	2%	0.239	8%
VPH 45	5,000[a]	84	2.514	0.092	4%	0.127	5%	0.124	5%	0.117	5%	0.158	6%
	10,000[a]	84	3.606	0.172	5%	0.263	7%	0.277	8%	0.306	8%	0.325	9%
VPH 51	5,000[a]	84	2.301	0.150	7%	0.198	9%	0.171	7%	0.122	5%	0.230	10%
	10,000[a]	84	3.329	0.156	5%	0.323	10%	0.272	8%	0.274	8%	0.343	10%
VPH 52	5,000[a]	84	1.961	0.364	19%	0.275	14%	0.222	11%	0.122	6%	0.389	20%
	10,000[a]	84	2.756	0.095	3%	0.233	8%	0.150	5%	0.104	4%	0.239	9%
VPH 56	5,000[a]	84	2.280	0.123	5%	0.169	7%	0.147	6%	0.142	6%	0.209	9%
	10,000[a]	84	3.310	0.160	5%	0.266	8%	0.167	5%	0.131	4%	0.274	8%
VPH 58	5,000[a]	84	2.255	0.102	5%	0.113	5%	0.071	3%	0.040	2%	0.130	6%
	10,000[a]	84	3.121	0.158	5%	0.273	9%	0.172	6%	0.137	4%	0.276	9%
VPH 59	5,000[a]	84	1.822	0.070	4%	0.165	9%	0.144	8%	0.153	8%	0.182	10%
	10,000[a]	84	2.663	0.079	3%	0.186	7%	0.154	6%	0.174	7%	0.218	8%
VPH 66	5,000[a]	84	2.126	0.087	4%	0.150	7%	0.159	7%	0.157	7%	0.194	9%
	10,000[a]	84	2.968	0.132	4%	0.247	8%	0.290	10%	0.312	11%	0.336	11%
VPH 68	5,000[a]	84	2.015	0.058	3%	0.129	6%	0.054	3%	0.045	2%	0.119	6%
	10,000[a]	84	2.823	0.098	3%	0.127	4%	0.103	4%	0.059	2%	0.173	6%
SiHa/ Jurkat	20,000 SiHa / 80,000 Jurkat[b]	84	3.303	0.148	4%	0.299	5%	0.107	3%	0.059	2%	0.333	5%
Hela/ Jurkat	2,500 HeLa/ 97,500 Jurkat[b]	84	2.495	0.121	5%	0.018	2%	0.098	4%	0.061	2%	0.026	3%
	10,000 HeLa / 90,500 Jurkat[b]	84	6.130	0.183	3%	0.027	3%	0.214	3%	0.088	1%	0.038	4%
Jurkat	10,000[b]	84	1.030	0.161	16%	0.059	6%	0.089	9%	0.029	3%	0.067	6%
	20,000[b]	84	1.003	0.026	3%	0.112	8%	0.013	1%	0.005	0%	0.116	8%
	100,000[b]	84	1.005	0.038	4%	0.156	5%	0.019	2%	0.008	1%	0.185	6%

[a] ADN plasmídico del VPH en la concentración indicada (copias/reacción) mezclado con 100 ng/reacción de ADN genómico de células VPH negativo (Jurkat).

[b] ADN genómico aislado de células VPH positivas (SiHa y HeLa) o células VPH negativas (Jurkat) en la concentración indicada (células/ml).

Tabla 19: Resumen de los resultados positivos del estudio de precisión de 21 días.

Objetivo	Copias/reacción[a] o Células/ml extraídas[b]	N	Media del ratio FOZ del VPH	VPH positivo % (n.º)			
				Operador 1	Operador 2	Operador 3	Total
VPH 16	5,000[a]	84	2.827	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	3.976	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 18	5,000[a]	84	2.236	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	3.182	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 31	5,000[a]	84	2.199	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	3.032	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 33	5,000[a]	84	1.840	89% (25)	100% (28)	100% (28)	96% (81)
	10,000[a]	84	2.622	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 35	5,000[a]	84	1.640	61% (17)	71% (20)	82% (23)	71% (60)
	10,000[a]	84	2.339	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 39	5,000[a]	84	2.078	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	2.986	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 45	5,000[a]	84	2.514	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	3.606	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 51	5,000[a]	84	2.301	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	3.329	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 52	5,000[a]	84	1.961	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	2.756	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 56	5,000[a]	84	2.280	96% (27)	100% (28)	100% (28)	99% (83)
	10,000[a]	84	3.310	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 58	5,000[a]	84	2.255	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	3.121	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 59	5,000[a]	84	1.822	82% (23)	100% (28)	100% (28)	94% (79)
	10,000[a]	84	2.663	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 66	5,000[a]	84	2.126	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	2.968	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 68	5,000[a]	84	2.015	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000[a]	84	2.823	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
SiHa/ Jurkat	20,000 SiHa / 80,000 Jurkat[b]	84	3.303	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
Hela/Jurkat	2500 HeLa / 97,500 Jurkat[b]	84	2.495	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000 HeLa / 90,000 Jurkat[b]	84	6.130	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
Jurkat	10,000[b]	84	1.030	4% (1)	0% (0)	4% (1)	2% (2)
	20,000[b]	84	1.003	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	100,000[b]	84	1.005	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

[a] ADN plasmídico del VPH en la concentración indicada (copias/reacción) mezclado con 100 ng/reacción de ADN genómico de células VPH negativo (Jurkat).

[b] ADN genómico aislado de células VPH positivas (SiHa y HeLa) o células VPH negativas (Jurkat) en la concentración indicada (células/ml).

Con 5000 copias/reacción, las muestras de ADN plasmídico presentaron un 97.2% (1143/1176) de los resultados positivos previstos. Con 10,000 copias/reacción, las muestras de ADN plasmídico presentaron un 100.0% (1176/1176) de los resultados positivos previstos (consulte la Tabla 19).

Reproducibilidad

La reproducibilidad de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ se evaluó en tres sitios externos mediante un panel de células de cultivo VPH positivas y negativas y muestras cervicouterinas VPH positivas y negativas. El ADN se extrajo de 2 ml de muestras cervicouterinas o células de cultivo suspendidas en la solución PreservCyt®. El ADN se extrajo mediante el kit de extracción de ADN Genfind™. Se extrajeron 16 muestras de ADN y se analizaron con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en tres sitios durante cinco días no consecutivos en un período de dos semanas. Se usaron dos lotes de pruebas de VPH de alto riesgo Cervista™ y tres lotes de Kits de extracción de ADN Genfind™ en los 3 sitios designados para el estudio. La cantidad total de mediciones para cada muestra fue de 15 (3 sitios x 5 días x 1 análisis por día). En la Tabla 20, se muestra un resumen de la coincidencia porcentual entre los resultados previstos y observados combinados para todos los sitios. La Tabla 21 presenta los resultados individuales de las muestras de todos los sitios junto a la media acumulada y la desviación estándar para el ratio FOZ del VPH.

Tabla 20: Resumen de datos del estudio multicéntrico de reproducibilidad de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™.

Resultado previsto	Cantidad de resultados	Resultados coincidentes	Coincidencia porcentual	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%
Positivo	210	208	99.0%	96.6%
Negativo	30	30	100.0%	88.7%

Tabla 21: Resumen de los resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para cada muestra de un estudio multicéntrico de reproducibilidad

Muestra	Tipo y concentración de la muestra (células/ml)	N	Ratio FOZ del VPH		VPH positivo % (n.º)			
			Media	Desviación estándar	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Total (n.º)
1 neg.	100,000 Jurkat	15	1.021	0.044	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
2 Pos.	10,000 HeLa 90,000 Jurkat	15	6.369	1.522	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
3 Pos.	5,000 HeLa 95,000 Jurkat	15	5.004	1.004	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
4 Pos.	2,500 HeLa 97,500 Jurkat	15	3.337	0.886	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
5 Pos.	20,000 SiHa 80,000 Jurkat	15	4.803	1.087	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
6 Pos.	10,000 SiHa 90,000 Jurkat	15	3.194	0.780	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
7 Pos.	5,000 SiHa 95,000 Jurkat	15	2.401	0.970	100 (5)	60 (3)	100 (5)	13
8 Pos.	5,000 SiHa 2,500 HeLa 12,500 Jurkat	15	3.402	0.774	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
9 Pos.	Combinación de muestras cervicouterinas (A5/A6 Pos.)	15	5.930	2.212	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15

10 Pos.	Combinación de muestras cervicouterinas (A5/A6 Pos.)	15	8.359	2.532	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
11 Pos.	Combinación cervicouterina (A7 Pos.)	15	5.793	1.493	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
12 Pos.	Combinación cervicouterina (A7 Pos.)	15	7.127	1.762	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
13 Pos.	Combinación cervicouterina (A9 Pos.)	15	8.008	2.313	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
14 Pos.	Combinación cervicouterina (A9 Pos.)	15	7.735	2.318	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
15 Pos.	Combinación cervicouterina (Pos. mezclado)	15	7.345	2.143	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
16 neg.	Combinación cervicouterina (neg.)	15	1.196	0.137	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0

Sustancias interferentes

Las cuatro muestras cervicouterinas (una VPH negativa y tres VPH positivas) y las tres muestras de líneas de células (una VPH negativa, tres VPH positivas) descritas en la Tabla 22 se analizaron con interferentes que podrían estar presentes en la muestra cervicouterina o transferirse de manera inadvertida durante la extracción de la muestra mediante el Kit de extracción de ADN Genfind™ (Tabla 23). Los niveles de concentración se eligieron para representar las condiciones extremas que podrían producirse durante la obtención de la muestra si el cuello del útero no se limpia previamente. Se aisló el ADN de las muestras puras e impuras mediante el Kit de extracción de ADN Genfind™ y se analizó con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ para evaluar la interferencia producida por las sustancias introducidas.

Tabla 22: Descripciones de las muestras con sustancias interferentes

Muestra	Descripción
Muestra de células cervicouterinas VPH positivo	Muestra cervicouterina almacenada en la solución PreservCyt® Resultado de la PCR/Secuenciación: “positivo”
Muestra de células cervicouterinas VPH negativo	Muestra cervicouterina almacenada en la solución PreservCyt® Resultado de la PCR/Secuenciación: “negativo”
Jurkat	Muestra de línea de células almacenada en la solución PreservCyt® con 100,000 células/ml Jurkat (VPH negativo)
SiHa/Jurkat	Muestra de línea de células almacenada en solución de PreservCyt® con 10,000 células/ml SiHa (VPH positivo) y 90,000 células/ml Jurkat
HeLa/Jurkat	Muestra de línea de células almacenada en solución de PreservCyt® con 5,000 células/ml HeLa (VPH positivo) y 95,000 células/ml Jurkat

Tabla 23: Resultados de las sustancias interferentes

Sustancias interferentes		Concentraciones analizadas	¿Se observa interferencia?
Fuente	**Tipo**		
Muestra de células cervicouterinas	Sangre	Detectable visualmente	No
	Mucosa	Detectable visualmente	No
	Sangre/mucosa	Detectable visualmente	No
	Irrigación vaginal	0.5%, 2%	No
	Jalea anticonceptiva	0.5%, 2%	Sí [a]
	Crema antimicótica con 2% de clotrimazol	0.5%, 2%	Sí [a]
	Crema antimicótica con 4% de miconazol	0.5%, 2%	Sí [a]
Kit de extracción de ADN Genfind™ Procesamiento de la muestra	Solución PreservCyt®	0.5%, 2%	No
	70% de etanol	5%, 10%	Sí[b]
	Microesferas magnéticas	5%, 10%	Sí[b]

[a]Los niveles de sustancias interferentes requeridos para producir fallas en las pruebas (2%) son inusualmente elevados y no deben encontrarse en las muestras clínicas reales.
[b]Los niveles de sustancias interferentes que pueden producir fallas en las pruebas son inusualmente elevados y no deben encontrarse en las muestras de ADN purificadas.

Durante la extracción de ADN, la jalea anticonceptiva mostró una interferencia detectable visualmente con la separación de las microesferas magnéticas en el amortiguador de Tris de 10 mM, que produjo una recuperación baja del ADN y una muestra de ADN insuficiente para la prueba.

Los niveles de sustancia interferente requeridos para provocar fallas en las pruebas son inusualmente elevados y no deben encontrarse en las muestras clínicas reales si el médico sigue el procedimiento de muestreo citológico cervicouterino correspondiente, que consiste en limpiar el cuello uterino antes de obtener la muestra de células para la citología cervicouterina.

Reactividad cruzada

Se analizó un panel bacteriano, micótico y vírico, que se encuentra comúnmente en el aparato anogenital femenino, como también varios tipos de virus de papiloma humano clonado de riesgo bajo o indeterminado, con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, para evaluar la posible reactividad cruzada (consulte las Tablas 24 a 26).

Tabla 24: Los microorganismos enumerados a continuación se agregaron a la solución PreservCyt® en concentraciones de aproximadamente 1 $x10^5$ cfu/ml y $1x10^7$ cfu/ml. Se extrajo ADN de estos microorganismos y una línea celular negativa (Jurkat, $1x10^5$ células/ml) mediante el kit de extracción de ADN Genfind™. Todas las muestras presentaron resultados negativos con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™.

Candida albicans	*Proteus vulgaris*
Corynebacterium pseudodiptheriticum	*Staphylococcus aureus*
Enterococcus faecalis	*Staphylococcus epideridis*
Escherichia coli	*Streptococcus mitis*
Lactobacillus acidophilus	*Streptococcus pyogenes*

Tabla 25: El ADN purificado que se obtuvo de los organismos enumerados a continuación se analizó en concentraciones de $1x10^5$ copias/reacción y $1x10^7$ copias/reacción mediante la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™. Todas las muestras generaron resultados negativos.

Virus del herpes simple, tipo 1 (VHS-1)	*Chlamydia trachomatis*
Virus del herpes simple, tipo 2 (VHS-2)	*Neisseria gonorrhoeae*
Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1, regiones pol y env)	*Neisseria meningitides*
	Mycoplasma hominis

Tabla 26: El ADN clonado o los amplicones de la PCR de las siguientes muestras se analizaron en concentraciones de $1x10^5$ copias/reacción y $1x10^7$ copias/reacción, o lo que se especifique. La prueba de VPH de alto riesgo de Cervista™ no mostró reactividad cruzada con los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 42, 43, 44 y 53. Las muestras de VPH de tipo 1a y el control interno generaron resultados negativos.

Virus de papiloma humano tipo 1a	Virus de papiloma humano tipo 44
Virus de papiloma humano tipo 6	Virus de papiloma humano tipo 53
Virus de papiloma humano tipo 11	Virus de papiloma humano tipo 67*
Virus de papiloma humano tipo 42	Virus de papiloma humano tipo 70*
Virus de papiloma humano tipo 43	Gen de control interno humano

*Los tipos 67 y 70 de virus de papiloma humano presentaron resultados positivos con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en $1x10^5$ y $1x10^7$ copias/reacción. En una valoración de una disolución posterior de estas muestras, se obtuvieron resultados negativos de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en 1000 copias/reacción y 10,000 copias/reacción, respectivamente.

Además, se analizó ADN extraído de un panel de doce muestras cervicouterinas que se almacenaron en la solución PreservCyt® y previamente se confirmaron como portadoras de tipos de VPH de riesgo bajo o indeterminado (tipos 6, 42, 43, 44, 53 ó 70) por la PCR/secuenciación, con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, y obtuvo resultados negativos.

Se realizó un estudio adicional de reactividad cruzada de *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitides* y *Mycoplasma hominis* mediante organismos completos añadidos en la solución PreservCyt® con células Jurkat VPH negativas (100,000 células/ml). Se prepararon tres lotes de cada organismo y se aisló el ADN de todas las muestras mediante el Kit de extracción de ADN Genfind™. Este estudio demostró que la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ no reacciona de forma cruzada con el ADN aislado de las muestras de PreservCyt® que contienen hasta 1.0×10^7 cfu/ml de *Neisseria gonorrhoeae* y N*eisseria meningitides,* $5x10^6$ cfu/ml de *Mycoplasma hominis* y 1.0×10^6 cfu/ml de *Chlamydia trachomatis*.

REFERENCIAS

1. Wallboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 189(1):12-19.
2. Sitio Web del National Cancer Institute (Instituto Nacional del Cáncer): www.cancer.gov (2008).
3. Meijer CJ, Snijders PJ, y Castle PE. 2006. Clinical utility of HPV genotyping. Gynecol Oncol 103: 12-17.
4. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM; ALTS Group. 2007. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. J Infect Dis Jun 1;195(11):1582-1589. Epub 2007 Apr 16.
5. Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR, Rush BB, Demuth F, Schiffman M. 2002. Absolute risk of a subsequent abnormal Pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. Cancer Nov;95(10):2145-2151.
6. Sherman ME, Schiffman M, y Cox TJ. 2002. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). Jour Nat Can Inst 94(2): 102-107.
7. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2002. Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. JAMA 287: 2120-2129.
8. Solomon D, Schiffman M, and Tarone R. 2001. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. Jour Nat Can Inst 93(4): 293-299.
9. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, and Mody DR. 2004. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the college of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. Arch Path Lab Med 128: 1224-1229.
10. Mayrand MH, E Duarte-Franco, I Rodrigues, SD Walter, J Hanley. 2007. A Ferenczy, S Ratnam, F Coutlée, EL Franco. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. N Engl J Med 357(16): 1579-1588.
11. Wheeler CM, WC Hunt, M Schiffman, PE Castle.2. 2006. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-Year risk of cervical cancer. J Infect Dis 194: 1291-1299.
12. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol Apr;55(4):244-265.
13. Woodman CBJ, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. Lancet Jun;357(9271):1831-1836.
14. Wallin K-L, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. 1999. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. N Engl J Med Nov;341(22):1633-1638.

15. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C, Saslow D. 2004. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. Obstet Gynecol 103: 304-309.

16. Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, et al. 2006. The absolute risk of cervical abnormalities in highrisk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. Cancer Res 66:10630-10636.

17. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki A-B, Smith RA, Eyre HJ, Cohen C. 2002. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA Can Jour Clin 53: 342-362.

18. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, and Solomon D. 2007. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. Am J Obstet Gynecol 197(4): 346-55.

19. Hall JG, Eis PS, Law SM, Reynaldo LP, Prudent JR, Marshall DJ, Allawi HT, Mast AL, Dahlberg JE, Kwiatkowski RW, de Arruda M, Neri BP, and Lyamichev VI. 2000. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. PNAS 97(15): 8272-8277.

20. Revzina N, DiClemente R. 2005. Prevalence and incidence of human papillomavirus infection in women in the USA: a systematic review. Int J of STD & AIDS 528-537.

21. Peyton C, Gravitt P, Hunt W, Hundley R, Zhao M, Apple R, Wheeler C. 2001. Determinants of Genital Human Papillomavirus Detection in a US Population. J Infect Dis 183:1554-1564.

22. Dunne E, Unger E, Sternberg M, McQuillan G, Swan D, Patel S, Markowitz L. 2007. Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. JAMA Feb; 297(8): 813-819.

23. Sherman M, et al. 2003. Baseline Cytology, Human Papillomavirus Testing, and Risk for Cervical Neoplasia: A 10-Year Cohort Analysis. Jour Nat Can Inst 95: 46–52.

24. Giuliano AR, Pepenfuss M, Abrahamsen M, et al. 2001. Human papillomavirus infection in the United States-Mexico border: implications for cervical cancer prevention and control. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10:1129-1136.

25. Liaw K, et al., 1999. Detection of Human Papillomavirus DNA in Cytologically Normal Women and Subsequent Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. J Natl Cancer Inst 91:954–960.

26. CLSI document EP17-A. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline.

27. Kondratovich M, Yousef W. (2005) Evaluation of Accuracy and 'Optimal' Cut-off of Diagnostic Devices in the Same Study. *Proceedings of the 2005 Joint Statistical Meeting, Biopharmaceutical Section*, p.2547-2551.

28. Arbyn M, et al. 2004. Virologic Versus Cytologic Triage of Women With Equivocal Pap Smears: A Meta-analysis of the Accuracy To Detect High-Grade Intraepithelial Neoplasia. J Natl Cancer Inst: 96:280-293.

GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Tabla 27: Guía de resolución de problemas

Observación	Causa probable	Solución
Volumen insuficiente para las mezclas de reacción	La cantidad de muestras ingresadas en la ficha "Selección del análisis" es inferior a las muestras agregadas a la placa	Vuelva a calcular en forma manual la cantidad requerida de mezcla de reacción necesaria para completar toda la placa.
		Vuelva a crear las copias de impresión del software usando la cantidad correcta de muestras.
	Se agregó un volumen de mezcla de reacción excesivo a la microplaca de 96 pocillos.	Verifique que se hayan agregado los volúmenes de mezcla de reacción correctos a cada pocillo.
		Verifique que la información de calibración del equipo esté actualizada.
El control negativo produce los siguientes resultados: • Aumento de la ganancia para el análisis 1 • Aumento de la ganancia para el análisis 2 • Aumento de la ganancia para ambos análisis	La configuración de la ganancia del lector de microplacas de fluorescencia es demasiado baja, por lo que hace que los valores de las señales de fluorescencia desciendan por debajo del requisito mínimo	Aumente la configuración de ganancia del fluorómetro para los análisis designados de modo que el control negativo produzca una señal mínima de 600 RFU y vuelva a leer la placa.
Se produjeron errores durante la importación de datos: "Verifique las configuraciones de resultados del FAM y el Red y lea toda la placa nuevamente. (No se permiten lecturas parciales de la placa.)" "Verifique la configuración de ganancia del FAM y lea toda la placa nuevamente. (No se permiten lecturas parciales de la placa.)" "Verifique la configuración de ganancia del Red y lea toda la placa nuevamente. (No se permiten lecturas parciales de la placa.)"	Problemas del fluorómetro	Consulte la Guía de resolución de problemas del Manual del usuario del software Invader Call Reporter™ para obtener información acerca de los problemas del fluorómetro que puedan ayudarlo a solucionar este error.
	El período de incubación fue más extenso que el tiempo recomendado	Confirme que la incubación se haya realizado en el período y la temperatura especificados.

El control negativo produce los siguientes resultados: CV porcentual alto (NTC del VPH) CV porcentual alto (NTC del ADNg)	Mezcla de reactivos insuficiente o inconstante	• Asegúrese de que todos los reactivos, las muestras y las mezclas de reacción se mezclen completamente. • Al agregar una mezcla de reacción a cada pocillo, coloque las puntas en la parte inferior del pocillo (debajo del aceite mineral) y transfiera con la pipeta lentamente hacia arriba y hacia abajo 3 ó 4 veces. • Asegúrese de que se expulse todo el líquido de la punta de la pipeta durante las adiciones. • Verifique que se haya agregado el reactivo correcto a cada pocillo. • Verifique que se hayan agregado los volúmenes de mezcla de reactivos correctos a cada pocillo. • Verifique que la información de calibración del equipo esté actualizada. • Inspeccione visualmente la placa para verificar que haya un volumen equivalente entre los pocillos.
	Preparación incorrecta de las mezclas de reacción	
	Adición inconsistente del control negativo o la mezcla de reacción a la microplaca	
	Sospecha de contaminación durante la adición de la muestra o la preparación de la mezcla de reacción	• Use puntas de barreras en aerosol sin nucleasa y tubos estériles al preparar las mezclas de reacción. • Use guantes durante la preparación de la prueba. • Asegúrese de que las puntas de las pipetas toquen sólo la solución que se administra. • No toque las puntas de las pipetas con las manos. • Limpie las superficies con los materiales adecuados.
	Evaporación de la muestra	Compruebe que se haya agregado aceite mineral a cada pocillo.
	Burbujas en los pocillos de la placa de reacción	De ser posible, centrifugue las placas antes de la prueba de fluorescencia.
	Las mezclas de reacción preparadas no se usaron dentro del período recomendado	Use las mezclas de reacción dentro de los 30 minutos de la preparación.

Los controles presentan un resultado de "Control no válido"	Mezcla de los controles insuficiente o inconstante	• Asegúrese de que todos los controles y reactivos se mezclen completa y consistentemente. • Al agregar una mezcla de reacción a cada pocillo, coloque las puntas en la parte inferior del pocillo (debajo del aceite mineral) y transfiera con la pipeta lentamente hacia arriba y hacia abajo 3 ó 4 veces. • Asegúrese de que se expulse todo el líquido de la punta de la pipeta durante las adiciones. • Asegúrese de que se haya agregado el control correcto a cada pocillo. • Asegúrese de que se haya agregado el volumen de control correcto a cada pocillo. • Revise la información de calibración del equipo. • Inspeccione visualmente la placa para verificar que haya un volumen equivalente entre los pocillos.
	Adición inconstante de la mezcla de reacción	
	Adición insuficiente o inconstante del control	
	No se agregaron los controles correctos a la placa o no se agregaron en la posición correcta de la placa	Verifique que se hayan agregado los controles correctos en las posiciones de la placa adecuadas.
	El período de incubación fue más corto o más extenso que el tiempo recomendado	Confirme que la incubación se haya realizado en el período y la temperatura especificados.
	Sospecha de contaminación durante la adición de la muestra	Use puntas con barrera de aerosol sin nucleasa y tubos estériles durante la configuración.
		Use guantes durante la preparación de la prueba.
		Asegúrese de que las puntas de las pipetas toquen sólo la solución que se administra.
		No toque las puntas de las pipetas con las manos.
		Limpie las superficies con los materiales adecuados.
	Evaporación de la muestra	Compruebe que se haya agregado aceite mineral a cada pocillo.
	Orientación de la placa incorrecta	Al analizar la placa, oriéntela de manera que el pocillo A-1 esté en la esquina superior izquierda.
	Burbujas en los pocillos de la placa de reacción	De ser posible, centrifugue las placas antes de la prueba de fluorescencia.

	Las mezclas de reacción preparadas no se usaron dentro del período recomendado	Use las mezclas de reacción dentro de los 30 minutos de la preparación.
La muestra presenta un resultado de "IND: CV porcentual alto"	Mezcla de las muestras insuficiente o inconstante	• Asegúrese de que todos los reactivos y las muestras se mezclen completamente. • Al agregar una mezcla de reacción a cada pocillo, coloque las puntas en la parte inferior del pocillo (debajo del aceite mineral) y transfiera con la pipeta lentamente hacia arriba y hacia abajo 3 ó 4 veces. • Asegúrese de que se expulse todo el líquido de la punta de la pipeta durante las adiciones. • Verifique que se haya agregado la muestra correcta a cada pocillo. • Verifique que se haya agregado el volumen correcto de la muestra a cada pocillo. • Verifique que la información de calibración del equipo esté actualizada. • Inspeccione visualmente la placa para verificar que haya un volumen equivalente entre los pocillos.
	Adición inconstante de la mezcla de reacción	
	Adición inconstante de la muestra	
	Sospecha de contaminación durante la adición de la muestra	Use puntas con barrera de aerosol sin nucleasa y tubos estériles durante la configuración.
		Use guantes durante la preparación de la prueba.
		Asegúrese de que las puntas de las pipetas toquen sólo la solución que se administra.
		No toque las puntas de las pipetas con las manos.
		Limpie las superficies con los materiales adecuados.
	Evaporación de la muestra	Compruebe que se haya agregado aceite mineral a cada pocillo.
	Burbujas en los pocillos de la reacción	De ser posible, centrifugue las placas antes de la prueba de fluorescencia.
	Las mezclas de reacción preparadas no se usaron dentro del período recomendado	Use las mezclas de reacción dentro de los 30 minutos de la preparación.

La muestra presenta un resultado de "IND: ADNg bajo"	Cantidad insuficiente de células en la muestra	• Mezcle bien el pocillo de la muestra y repita la extracción de ADN. • Verifique que se haya agregado el volumen correcto de la muestra a cada pocillo. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN.
	Sospecha de error durante la extracción de ADN	
	En la prueba, se utilizó una cantidad insuficiente de ADN	
	Inhibición de la muestra de ADN	Repita la extracción de ADN de la muestra.
		Consulte prospecto incluido en el envase, en la sección Características de los resultados (Sustancias interferentes).
	Es posible que las muestras de ADN no puedan desnaturalizarse por completo antes de la prueba	Asegúrese de que la muestra se haya desnaturalizado a la temperatura correcta y durante el tiempo adecuado.
La muestra presenta un resultado de "IND: FOZ del VPH bajo"	Sospecha de error durante la extracción de ADN	• Repita la extracción de ADN de la muestra. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN. • Consulte el prospecto incluido en el envase, en la sección Características de rendimiento (Sustancias interferentes).
	Inhibición de la muestra de ADN	
Volumen de ADN de la muestra insuficiente	Volumen de elución insuficiente durante la extracción de ADN	Repita la extracción de ADN de la muestra.
		Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN.
Cantidad alta de muestras de ADN con valores FOZ del FAM positivos en las tres mezclas de reacción	Sospecha de error durante la extracción de ADN	• Repita la extracción de ADN de la muestra. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN.
	Sospecha de contaminación del reactivo de extracción de ADN	

INFORMACIÓN DE CONTACTO:

Fabricante:
Third Wave Technologies, Inc.,
502 S. Rosa Road,
Madison, WI, 53719 EE.UU.
Teléfono: 608.273.8933
Sitio Web: www.twt.com

Soporte técnico:
Third Wave Technologies, Inc.,
Teléfono: 888-898-2357, opción 3

AVISO PARA EL DESTINATARIO ACERCA DE LA LICENCIA LIMITADA

La recepción de este producto de Third Wave Technologies, Inc. o su distribuidor autorizado incluye una licencia limitada no exclusiva conforme a los derechos de patente de Third Wave Technologies, Inc. La adquisición de este producto constituye la aceptación de la licencia limitada por parte del destinatario. Los destinatarios que no deseen aceptar la licencia limitada deberán devolver el producto para obtener un reembolso completo. Dicha licencia tiene el único propósito de usar este producto para detectar un analito específico. Para evitar dudas, la licencia anterior no incluye derechos de uso de este producto para aplicaciones agrícolas o veterinarias. La anterior licencia no incluye una licencia de uso del producto para nuevas investigaciones o desarrollos, fabricación del producto ni objetivo alguno de ingeniería inversa. El comprador de este producto no está autorizado a transferirlo a terceros, con ningún fin, sin el consentimiento expreso por escrito de Third Wave Technologies, Inc. A excepción de lo especificado expresamente en este párrafo, no se otorga ninguna otra licencia expresa, implícita o por exclusión. Para obtener información acerca de la disponibilidad de licencias adicionales para poner en práctica las metodologías patentadas, comuníquese con:

Legal Department, Third Wave Technologies, Inc., 502 South Rosa Rd., Madison, WI, 53719, (608) 273-8933.

La prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ una química Invader® propietaria y componentes específicos cubiertos por las siguientes patentes: N.º de patentes de EE.UU. 5,614,402; 5,795,763; 5,846,717; 5,985,557; 5,994,069; 6,001,567; 6,090,543; 6,090,606; 6,348,314, 6,458,535; 6,555,357; 6,562,611; 6,635,463; 6,673,616; 6,759,226; 6,872,816; 6,875,572; 6,913,881; 7,060,436; 7,067,643; 7,087,381; N.º de patentes canadienses. 2,163,015; 2,203,627; N.º de patentes australianas 694,736; 731,062; 737,449; 738,849; 744,369; 779,443; 781,188; N.º de patente japonesa 3,665,648; N.º de patente europea 711,361. Todas las patentes estadounidenses y extranjeras, según corresponda, que se hayan emitido o se emitan, en lo sucesivo, respecto de las solicitudes de dichas patentes, así como todas las solicitudes de patentes y las patentes estadounidenses o extranjeras que se emitan por consiguiente, según corresponda, cuyo objeto, en su totalidad o en parte, tenga derecho al beneficio de las fechas de solicitud de cualquiera de las patentes o solicitudes de patentes antes enumeradas en este prospecto del producto.

GARANTÍA LIMITADA DEL PRODUCTO

Third Wave Technologies, Inc. garantiza que este producto cumplirá las especificaciones establecidas en la hoja de información del producto. Si alguno de los componentes de este producto no cumple estas especificaciones, Third Wave Technologies, Inc. a discreción propia, con responsabilidad única y exclusiva, y como recurso único y exclusivo de los usuarios, reemplazará el producto sin cargo o reembolsará el costo del mismo, siempre que se notifique del incumplimiento a Third Wave Technologies, Inc. dentro de los sesenta (60) días de la recepción del producto.

Esta garantía limita la responsabilidad de Third Wave Technologies, Inc. al reemplazo o el reembolso del costo de este producto. THIRD WAVE TECHNOLOGIES, INC. NO PROPORCIONA NINGUNA OTRA GARANTÍA, EXPRESA O IMPLÍCITA, INCLUIDAS, ENTRE OTRAS, LA GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZACIÓN O ADECUACIÓN PARA UN FIN PARTICULAR O NO INCUMPLIMIENTO. Third Wave Technologies, Inc. no tendrá responsabilidad alguna por daños directos, indirectos, consecuentes o incidentales que surjan del uso, de los resultados del uso o de la incapacidad de uso de este producto y sus componentes.

Third Wave®, Cleavase® e Invader® son marcas comerciales registradas de Third Wave Technologies, Inc. Cervista™ e Invader Call Reporter™ son marcas comerciales registradas de Third Wave Technologies, Inc. Todas las demás marcas y marcas comerciales registradas de este prospecto del producto son propiedad de cada una de sus respectivas compañías.

Algunos componentes del análisis del ácido nucleico, como las composiciones y los métodos específicos de manipulación o visualización de los ácidos nucleicos que se deben analizar, pueden estar cubiertos por una o más patentes de terceros. De forma similar, los ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos específicas pueden estar patentados. La fabricación, el uso o la venta de estos componentes o ácidos nucleicos pueden requerir de una o más licencias. Ninguna parte del contenido de este documento debe considerarse como una autorización o licencia implícita de fabricación, uso o venta de ningún componente o ácido nucleico protegido por dichas patentes.

©2009 Third Wave Technologies, Inc.

P/N 15-3100-2401, Revisión 100